

エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究

所属 独立行政法人 国立健康・栄養研究所
研究者 大坂 寿雅

分担研究者

エーザイ株式会社、研究開発本部創薬第 III 研究所 田中 勲

要旨

食事誘導性熱産生には腸内の浸透圧情報が迷走神経を介して脳に伝わり、交感神経活動と副腎髄質アドレナリン分泌を介して誘起される機構が存在することが分かった。また、ジペプチジルペプチダーゼ IV の阻害は肥満やインスリン抵抗性を改善するという結論を得た。

1. 研究目的

エネルギー摂取が消費を上回ることが肥満の原因であり、糖尿病・高血圧・高脂血症などの生活習慣病の多くは肥満が誘因であり憎悪因子であることは一般に良く認識されている。とりわけ、成人においてはエネルギー消費の低下が肥満の原因として重要な意味を持つ。

エネルギー消費は基礎代謝、運動、体温調節、そして食事誘導性熱産生(diet-induced thermogenesis, DIT)とに主に分けられる。このうち DIT は、食事を摂った後の数時間にわたって安静時代謝率以上のレベルにエネルギー代謝率が増加する現象である。DIT は食物が生体内で消化され、栄養素が吸収・代謝・貯蔵されるのに不可避な熱産生と、それ以外の条件的熱産生とに分けられる。しかしながらその脳および生理機構に関しては未だ不明の点が多い。DIT による消費エネルギー量は食物のエネルギー量のおおよそ 10%であるが、特別な身体運動をしないヒトにでも起きるので、長期的に見れば体重に顕著な影響をおよぼさう。したがって、DIT の大きさを調節することができれば生理的な機構を介した生活習慣病対策となり有用である。また、DIT の生理機構は体温調節反応としての非ふるえ熱産生と共通した部分が多く、この反応も無意識のうちにおきる生理反応であるので意識的な努力を要せず、副作用のないエネルギー消費薬の作用点としての候補である。

そこで、エネルギー消費の生理機構を明らかにし、肥満症およびこれに起因する生活習慣病の治療および予防薬開発に関する基礎的知見を得ることを目的とする。このため DIT に注目し、その脳・自律神経系・分子レベルでの機構の解明をめざした。食事が腸管に流入する刺激により、GLP-1 や GIP といったペプチドが分泌され、膵臓からのインスリン分泌を増強すると言われている。これらペプチドの生理機能につい

ては不明な点が多く、膵臓の内分泌細胞だけでなく、中枢を介した作用も予想されている。そこで膵臓機能に対する作用を、これらペプチドの不活性化メカニズムを修飾することにより制御できないかどうかを検討する。具体的には分解酵素 DPP IV 阻害剤が食後高血糖を是正することができるかどうかを検討する。また、このときインスリン分泌動態はどのように変化しているのか？膵臓機能の維持への影響はどのくらいあるのか？等にも注目して検討した。

メルクマニュアルによると米国においては一年に 280,000 人が肥満が原因で死亡していると推定されており、これは死亡原因としては喫煙に次ぐものである。また日本人成人五人に一人が生活習慣病のリスクをもつ肥満者であり、生活習慣病の医療費に占める割合は三分の一に及ぶので、肥満および肥満に基づく生活習慣病の対策に役立つ薬物の創出は医療費削減と生活習慣病患者の QOL を向上させることから必要性が高いものである。

2. 研究方法

ウレタン(1.2 g/kg)麻酔下でウィスター系雄ラットの酸素消費量と二酸化炭素産生量を測定することでエネルギー代謝率を経時的に求めた。同時に、結腸および皮膚の温度を連続測定した。十二指腸にカニューレを装着し、20%ブドウ糖、3.6%食塩水または生理的食塩水を注入した。腸からの浸透圧情報の上行経路を明らかにする目的で、迷走神経を横隔膜下で切断したラットと内臓神経を腹腔神経節と上副腎神経節間で切断したラットを用いて、腸を浸透圧刺激しエネルギー代謝率及ぼす影響を調べた。侵害受容器を刺激している可能性を検討するために、カプサイシン脱感作ラットを作成した。脳の関与を明らかにするために除脳および脊髄ラットを用いた。交感神経系およびアドレナリン受容体の寄与を明らかにするために、プロプラノロール前投与を行った。迷走神経遠心路の寄与を明らかにするためにアトロピン前投与を行った。発熱時の熱産生との違いを明らかにするためにインドメタシン前投与を行った。また、腸内浸透圧刺激後の血液を経時的に採取し、血漿中のアドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン濃度を測定した。

インクレチン GLP-1 とその生理的分解酵素であるジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) の糖代謝やエネルギー代謝における役割を解析する目的で、以下の実験を計画した。まず DPP IV 遺伝子欠損ラット F344/DuCrj を高脂肪食あるいは通常食で飼育し (4 週齢から 10 週齢まで)、摂食量、体重、GLP-1 値、インスリン値、インスリン抵抗性 (HOMA index)、耐糖能テスト、などを測定または実施し、肥満症薬や糖尿病治療薬の作用点としての妥当性を考察した。次に、糖尿病モデル病態マウスとして広く使用されている db/db マウスに DPPIV 阻害剤バリンピロリグaidを投与し、食後高血糖に対する効果を経口耐糖能試験を実施し調べた。また、同時に GLP-1 やインスリンの測定を行い、分泌に及ぼす影響を解析した。本試験を 6 週齢と 23 週齢のマウスでそれぞれ行い、病態の進行による薬理効果の違いを考察した。さらに、ピグアナイド剤 (メトフォルミン、フェンフォルミン、ブフォルミン) は活性型 GLP-1 値を上昇させるといわれているのが、GLP-1 の生体内の半減期は 1 分以内と短く、正確な測定は困難で、結論は出ていなか

った。そこで、DPP IV 遺伝子欠損ラット F344/DuCrj に上記ピグアナイド剤を投与し、様々な条件下で GLP-1 分泌に対する影響を解析した。

3. 研究成果

腸に高浸透圧溶液を注入して誘起されるエネルギー消費反応は迷走神経切断によって減弱し、内臓神経切断では影響なかった。迷走神経遠心終末の伝達を遮断するアトロピン前投与も効果がなかった。迷走神経の求心繊維が関与していた。この求心繊維に関しては、カプサイシン脱感作動物では正常動物と同程度の反応がおきたので、侵害受容繊維とは関係なかった。前脳の関与を明らかにするために除脳を行ったが反応には影響なく、また発熱を阻害する量のインドメタシン前投与も効果がなかった。末梢機構を明らかにするために β アドレナリン受容体拮抗薬であるプロプラノロールを前投与したところエネルギー消費反応は抑制された。副腎髄質摘除あるいは副腎交感神経切断ラットでも反応は抑制された。したがって、副腎交感神経活動の亢進とアドレナリン分泌がこの反応に重要であることが分かった。腸内に 3.6%食塩水または 20%ブドウ糖を投与後 20 分で血漿アドレナリン濃度は有意に増加し、その後は投与前の値に戻った。血漿ノルアドレナリン濃度は投与後 20-120 分間有意に増え、ドーパミン濃度は変化しなかった。したがって、副腎交感神経活動の亢進とアドレナリン分泌がこの反応の初期 1 時間に重要であり、交感神経活動の亢進が全体のエネルギー消費に関わっていることが分かった。

DPP IV 遺伝子欠損ラット F344/DuCrj を高脂肪食（4 週齢から 10 週齢まで）飼育したところ、対照の F344/Jcl ラットに比較して顕著な摂食量の低下、体重の低下が観察された。経口グルコース投与による耐糖能試験での血中グルコース値は対照群に比較して有意に低く、インスリン抵抗性指標値（HOMA index）も対照群に比較して顕著に低かった。血中 GLP-1 値は、DPP IV 遺伝子欠損ラットで著しい高値を示し、GLP-1 の摂食抑制作用、インスリン分泌応答正常化作用が摂食量と体重の増加抑制の原因と考えられた。以上から、DPPIV 阻害機序による GLP-1 作用増強薬は、エネルギー代謝を改善する生活習慣病治療薬となる可能性があると考えられた。

db/db マウス（6 週齢または 23 週齢）に DPPIV 阻害剤バリンピロリダイドを投与し、食後高血糖に対する効果を調べたところ、6 週齢マウスでは、GLP-1 分泌の増加とインスリン分泌の増加、血糖値の低下が観られたが、23 週齢マウスでは、GLP-1 分泌の増加とインスリン分泌の増加は観られたが、血糖値の改善は見られなかった。高週齢の db/db マウスではインスリン抵抗性の上昇があるため、血糖値の低下まで至らなかったものと考えられた。このことから、DPPIV 阻害機序による糖尿病治療の適応は、軽症糖尿病もしくは耐糖能障害と考えられた。

DPP IV 遺伝子欠損ラット F344/DuCrj にピグアナイド剤（メトフォルミン、フェンフォルミン、ブフォルミン）を投与し、活性型 GLP-1 が顕著に上昇する事を確認した。ピグアナイド剤の作用機序の全貌は尚不明であるが、少なくとも一部は、GLP-1 の上昇を介したものと考えられた。なお、報告されているよう

な直接の DPPIV 酵素阻害活性は観察されなかった。

4. 考察・まとめ

腸管内に入ってくる食物成分はそれを構成する化学物質に固有の化学的性質によらず、一般的な物理化学的性質である浸透圧上昇が DIT を引き起こす信号のひとつであることが明らかになった。この情報は迷走神経で感受され、下位脳幹に伝わり、交感神経系を興奮させ、副腎髄質からアドレナリン分泌をおこることによりエネルギー消費を促進するという機構を見いだした。また、栄養素が吸収された後には血漿浸透圧の上昇によってもエネルギー消費促進反応がおき、これには骨格筋が熱産生であることが示唆され、アドレナリン受容体は関与していなかった。DPP IV 遺伝子欠損ラット F344/DuCrj を高脂肪食で飼育したところ、対照の F344/Jcl ラットに比較して顕著な摂食量の低下、体重の低下が観察された。血中 GLP-1 値は、DPP IV 遺伝子欠損ラットで著しい高値を示し、GLP-1 の摂食抑制作用、インスリン分泌応答正常化作用が摂食量と体重の増加抑制の原因と考えられた。DPPIV 阻害機序による GLP-1 作用増強薬は、エネルギー代謝を改善する生活習慣病治療薬となる可能性が高いと考えられた。

5. 研究発表

- 1) Osaka, T., Kobayashi, A. and Inoue, S. Vago-sympathoadrenal reflex in thermogenesis induced by osmotic stimulation of the intestines in the rat, *Journal of Physiology*, **540**: 665-671, 2002.
- 2) Kageyama, A., Hirano, T., Kageyama, H., Osaka, T., Namba, Y., Tsuji, M., Adachi, M. and Inoue, S. Distinct role of adiposity and insulin resistance in glucose intolerance: Studies in VMH-lesioned obese rats, *Metabolism*, **51**: 716-723, 2002.
- 3) Kashiba, M., Oka, J., Ichikawa, R., Kasahara, E., Inayama, T., Kageyama, A., Kageyama, H., Osaka, T., Umegaki, K., Matsumoto, A., Ishikawa, T., Nishikimi, M., Inoue, M., Inoue, S. Impaired ascorbic acid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats, *Free Radical Biology & Medicine*, **33**: 1221-1230, 2002.
- 4) Yasuda N., Nagakura T., Yamazaki K., Inoue T., and Tanaka I., Improvement of high fat-diet-induced insulin resistance in dipeptidyl peptidase IV-deficient Fischer rats. *Life Sciences*, **31**:71(2):227-38 2002
- 5) Yasuda N., Inoue T., Nagakura T., Yamazaki K., Kira K., Saeki T., and Tanaka I., Enhanced secretion of glucagon-like peptide 1 by biguanide compounds, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**(5):779-784, 2002
- 6) Nagakura T., Yasuda N., Yamazaki K., Ikuta H., and Tanaka I., Enteroinsular axis of db/db mice and efficacy of dipeptidyl peptidase IV inhibition, *Metabolism: Clinical and Experimental*, **52**(1):81-86, 2003